

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 807–816

Methodische Untersuchungen und Vergleich von 7 kommerziellen Kits zur radioimmunologischen Thyrotropin-Bestimmung aus dem getrockneten Blutstropfen¹⁾

Von Dagmar van Thiel, I. Marschner, W. G. Wood, J. Habermann und P. C. Scriba

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

(Eingegangen am 30. Januar/19. Juni 1980)

Zusammenfassung: Zur Untersuchung Neugeborener auf konnatale Hypothyreose hat sich die Thyrotropin-Bestimmung aus dem getrockneten Blutstropfen auf Filterpapier durchgesetzt. Die vorliegende Arbeit untersucht methodische Probleme der Test-Optimierung anhand einer eigenen Methode in Gegenüberstellung zu Testkits. Geprüft wurde die Haltbarkeit der Proben sowie der Einfluß von Papierqualität, Plättchengröße, Entnahmezeitpunkt der Filterplättchen und Waschvorgang des Präzipitats auf das Analysenergebnis. Die zum Zeitpunkt der Untersuchung auf dem Markt befindlichen Kits unterscheiden sich erheblich hinsichtlich Testdauer, methodischem Aufwand, eingesetzter Plättchengröße (entspricht Probenvolumen) und Preis. Abgesehen von diesen formalen Unterschieden bestand keinerlei Übereinstimmung der erzielten Testergebnisse. Gravierende Unterschiede zeigten allein schon die beigegebenen Standardkonzentrationen, was bisher bei keiner Kittestung für andere Hormone in diesem Ausmaß gefunden wurde (Wiederfinderaten von 22 bis 185 % zum Vergleichsstandard). Es wird die Erarbeitung gemeinsamer Richtlinien und Qualitätskriterien sowie die Etablierung einer externen Qualitätskontrolle vorgeschlagen.

Development of a radioimmunoassay for thyrotropin (TSH) in dried blood spots together with a comparison of 7 commercial kits

Summary: The blood-spot thyrotropin RIA for detection of congenital hypothyroidism has been established as a screening programme. This article describes the problems in hand, namely optimisation of the method and a comparison of the performance in 7 commercial kits on the West German market. The following factors have been investigated:

- a. Shelf-life of standards and samples
- b. Effect of filter paper quality and weight
- c. Size of paper disc
- d. Blood sampling time
- e. Time of removal of paper disc
- f. Effect on the results of washing the precipitate.

The commercial kits at present on the market differ widely in method and price. Apart from this, there was no agreement between the results obtained, and the difference between the standard concentration given by the firm compared with the reference standard MRC 68/38 varied from 22–185%. Methodological guidelines and quality control measures, both internal and external, are suggested.

Einleitung

Zur Früherkennung der Neugeborenenhypothyreose hat sich die Bestimmung von Thyrotropin (TSH) aus Fersenblut am 5. Lebenstag in den letzten Jahren als anerkannte Methode etabliert (1). Aufgrund der jüngsten Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrie soll die Thyro-

pin-Messung aus dem Eluat von auf Filterpapier getrockneten Blutstropfen in Kombination mit dem Phenylketonurie-(PKU)-Test in ganz Deutschland als routinemäßige Screening-Untersuchung eingeführt werden. Der Aufbau einer externen Qualitätskontrolle für diesen Test wird eine notwendige Konsequenz sein. Da in Deutschland derzeit mindestens sieben Firmen Kits zur Thyrotropin-Bestimmung beim Neugeborenen anbieten, kann davon ausgegangen werden, daß die Laboratorien, die das Thyrotropin-Screening in ihr Programm aufnehmen werden bzw. bereits aufgenommen haben, mit unterschiedlichen

¹⁾ Mit Unterstützung des BMFT

Methoden arbeiten. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Studie sieben kommerzielle Kits, die zu Beginn der Untersuchungen erhältlich waren, und eine eigene Methode auf ihre Vergleichbarkeit geprüft.

Material und Methoden

Eigener Test

Die eigene Methode zur Thyrotropin-Bestimmung aus dem getrockneten Blutstropfen wurde als Modifikation des in unserer Klinik aufgebauten Routine-Radioimmunoassays zur Thyrotropin- und Parathormon-Messung im Serum entwickelt (2, 3, 4).

Standards

Thyrotropin-armem heparinisierten Blut (Thyrotropin-Konzentration etwa 0,8 mE/l Serum) wurde Standard-Thyrotropin MRC 68/38 (NIBSC, Holly Hill, London) zugesetzt. Ausgehend von einer Thyrotropin-Basiskonzentration von 200 mE/l Blut wurde eine geometrische Verdünnungsreihe angelegt. Je 50 µl der Thyrotropin-Standardverdünnungen 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,12 und Null mE/l wurden auf Filterpapier (Phenylketonurie-Testkarten des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Südbayern, Fachbereich Medizin, München = Filterpapier Firma Schleicher und Schüll, Dassel, Nr. 2992) aufgetropft, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren. Vor Beginn eines Assays wurden aus den Blutflecken runde Scheibchen mit einem Durchmesser von 8 mm ausgestanzt (Stanze – Firma Henning, Berlin).

Kontrollen

Kontrolle A = In vitro hergestellte Vollblutverdünnung mit einem Thyrotropin-Zusatz von 50 mE/l Blut.

Kontrolle B = Vollblut eines athyreoten Spenders (Unterbrechung der Substitutionstherapie aus diagnostischen Gründen), 60 min nach Gabe von Thyroliberin (TRH) entnommen, mit einer Thyrotropinkonzentration von etwa 59 mE/l Serum.

Puffer

Natrium-Barbital-Puffer pH 7,4, Zusatz von 10 g/l humanem Serumalbumin und 500 000 KIE/l Aprotinin (Trasylo[®], Bayer, Leverkusen).

Anti-Thyrotropin-Antikörper (1. AK)

Thyrotropin-Antiserum R2/74 vom Kaninchen, gewonnen durch eigene Immunisierung (5), Endverdünnung 1:37.500. Die Kreuzreaktivität gegenüber Folitropin (FSH), Lutropin (LH) und humanem Choriongonadotropin (HCG) lag unter 1 % (unter HCG-Zusatz (Primogonyl, Schering AG, Berlin) von 83 000 U/l Thyrotropin-Antiserum (1. AK)).

¹²⁵Iod-Thyrotropin

Markierung von Thyrotropin (Deutsche Kabi, München) mit Chloramin T nach Greenwood & Hunter (6). Pro Probe wurde eine Radioaktivität entsprechend 30 000 bis 50 000 Imp/min eingesetzt. Das Koppräzipitat (Doppelantikörpermethode) wurde dem Tracer zugesetzt: 7 µg Kaninchen-Gammaglobulin (Firma Serva, Heidelberg) pro Probe.

Präzipitierender Antikörper (2. AK)

Anti-Kaninchen-Gammaglobulin vom Esel (Firma Wellcome, Burgwedel), Verdünnung 1:24, bzw. Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege (Firma Pösel, Frankfurt) Verdünnung 1:50.

Trennverfahren

Zur Beschleunigung der Trennung von gebundenem und freiem Antigen (B/F-Trennung) wurde nach Zugabe des präzipitierenden Antiserums Polyethylenglykol 6000 (PEG) mit einer End-

konzentration von 30 g/l dem Reaktionsgemisch zugegeben (4). Nach 5 min Stehen erfolgt die Trennung durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 g (Roto Silenta/K. Fa. Hettich, Tuttlingen). Absaugen des Überstandes mit Kapillare und Pumpe.

Auswertung

Messung der Radioaktivität der Proben mit 16-Proben-Gamma-Counter (NE 1600, Firma Nuclear Enterprises, Edinburgh). Die Zählraten wurden auf Lochstreifen ausgegeben und auf einem Computer ausgewertet (System 404/3, Firma Siemens, München). Standardkurve und Hormonkonzentration der Proben wurden mit Hilfe der Spline-Approximation berechnet (7).

In Tabelle 1 ist die Durchführung des Assays schematisch zusammengefaßt.

Einflüsse auf die Empfindlichkeit der Standardkurve und die Präzision der Ergebnisse durch Variation einzelner veränderlicher Assaykomponenten wurden an der eigenen Methode getestet. Dazu wurden untersucht:

1. Stabilität von Thyrotropin im auf Filterpapier getrockneten Blutstropfen
2. Einfluß der Beschaffenheit des Filterpapiers
3. Einfluß der Plättchengröße
4. Einfluß des Entnahmezeitpunktes der Plättchen auf die Assay-Präzision
5. Waschen des Präzipitates.

Tab. 1. Pipettier- und Inkubationsschema der eigenen Methode

Reagenzien	Standard	Probe	Unspezifische Bindung	Testbesteck/Geräte
Filterpapier-scheibchen	1	1	1	Doppel- bzw. Dreifachansatz in Polystyrolröhrchen (75 x 11 mm), Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Na-Barbital-Puffer	200 µl	200 µl	200 µl	Hamiltonspritze
1. Antikörper	100 µl	100 µl	—	Hamiltonspritze
Gut durchmischen. Die Plättchen müssen ganz in Flüssigkeit eingetaucht sein.				Vortex-Genie, Scientific Industries, Springfield
Die Röhrchen bedecken. 5–6 h bei Raumtemperatur schütteln.				Parafilm, Fa. American Can Company, Greenwich; Synchro-Shaker, Fa. Abbott, Langen
15–16 h bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubieren.				
Alle Plättchen entfernen.				Pinzette
¹²⁵ I-TSH	100 µl	100 µl	100 µl	Hamiltonspritze
5–6 h bei Raumtemperatur inkubieren				kein Schütteln
2. Antikörper	100 µl	100 µl	100 µl	Hamiltonspritze
PEG 6000 (60 g/l)	500 µl	500 µl	500 µl	Brand-Dispensette, Fa. Brand, Wertheim
Nach 5 min Stehen 10 min lang bei 3000 g zentrifugieren, Überstand mit Kapillare und Pumpe absaugen und die Radioaktivität des Präzipitats messen.				Roto Silenta/K-Zentrifuge, Fa. Hettich, Tuttlingen. Gamma-Counter NE 1600, Fa. Nuclear Enterprises, Edinburgh

Es wurden sieben in Deutschland auf dem Markt erhältliche Kits (Nr. 1–7)²⁾ untersucht. Zunächst wurden die wichtigsten Parameter der einzelnen Kits in Methodik und Handhabung zusammengestellt.

Die Kits wurden dann in zwei Serien, die sechs Monate auseinanderlagen, getestet. Jede Serie bestand aus zwei Teilen:

1. Teil:

Durchführung von Radioimmunoassays nach den jeweiligen Kitvorschriften. Als unbekannte Proben wurden selbst präparierte Blutplättchen mit bekanntem Thyrotropin-Gehalt in die Assays eingesetzt (Standards aus eigenem Assay, Kontrolle B).

2. Teil:

Eigener Assay: Als unbekannte Proben wurden hier die Standards der Kits gemessen.

Serie 1 und Serie 2 der Untersuchungen waren bezüglich des methodischen Konzepts identisch. Abweichungen der Serien ergaben sich lediglich aus:

1. Verwendung unterschiedlicher Chargen sowohl in den kommerziellen Kits als auch im eigenen System. Die eigene Methode wurde bei Gebrauch frischer Standard- und Reagenzienchargen erneut durchgetestet und an die vorherigen Assaybedingungen adaptiert.

2. Veränderungen des Testbestecks und der Testvorschriften, die von Seiten einiger Firmen zwischen der 1. und 2. Untersuchungsserie vorgenommen worden waren.

3. In der ersten Serie wurden die Radioimmunoassays mit Doppelbestimmungen, in der zweiten Serie mit Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Ergebnisse

Eigener Test

Die Abbildung 1 zeigt das Beispiel einer mit der eigenen Methode erstellten Standardkurve.

Auf Tabelle 2 finden sich die Qualitätskontrolldaten zur eigenen Methode.

Untersuchungen zu einigen variablen Parametern

1. Stabilität von Thyrotropin im auf Filterpapier getrockneten Blutstropfen

Es wurden auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen mit bekanntem Thyrotropingehalt unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und in Assays mit jeweils frisch hergestellten Standards gemessen. Die Lagerzeit der Proben betrug 4 Monate bei -20°C , 1 Woche, 2 Wochen und 6 Wochen bei Raumtemperatur und 1 Woche bei 37°C .

²⁾ Kit Nr. 1 = Firma Serono, Freiburg, Lot Nr. 73902 und 73920
 Kit Nr. 2 = Firma Biosigma (Diagnostic Products) München, Lot Nr. 10 und 0015
 Kit Nr. 3 = Firma Henning, Berlin, Lot Nr. – keine Angaben
 Kit Nr. 4 = Firma DRG-Instruments (Nuclear Medical Laboratories) Marburg, Lot Nr. 9134 und 9162
 Kit Nr. 5 = Firma Deutsche Pharmacia, Freiburg, Lot Nr. 0697 und 0555
 Kit Nr. 6 = Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Lot Nr. – keine Angaben
 Kit Nr. 7 = Firma Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach, Lot Nr. 9073 und 9201

Dankenswerterweise haben uns einige Firmen das Testmaterial kostenlos zur Verfügung gestellt.

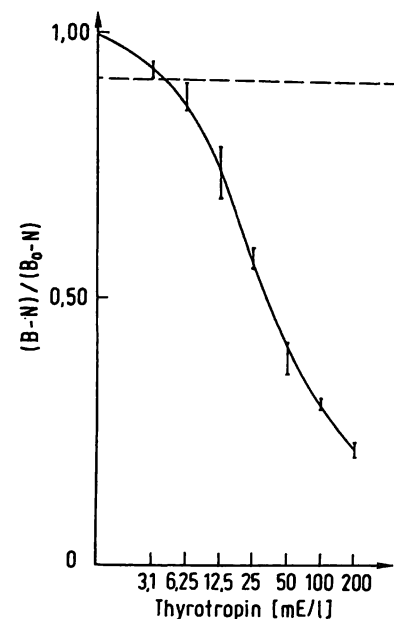


Abb. 1. Standardkurve für die Thyrotropin-Bestimmung aus dem getrockneten Blutstropfen – eigene Methode. Berechnung und Darstellung der Kurve mittels Spline-Approximation. Semilogarithmisches Koordinatensystem. Lineare Ordinate: Quotient aus gebundener Aktivität und dem Standardleerwert, jeweils nach Abzug der unspezifischen Bindung. Logarithmische Abszisse: Thyrotropin-Konzentration in mE/l.
 B = Zählrate der gebundenen Aktivität
 B₀ = Zählrate des Standardleerwertes
 N = Zählrate der unspezifischen Bindung
 Untere Thyrotropin-Nachweisgrenze = 4,0 mE/l
 50%-Intercept = 33,4 mE/l

Tab. 2. Qualitätskontrolldaten zur eigenen Methode

Untere Nachweisgrenze: ⁺ n = 15 \bar{x} = 6,4 mE/l
 50 %-Intercept: ⁺⁺ n = 15 \bar{x} = 31,3 mE/l

Präzision innerhalb der Serie

n	\bar{x}	s	VK (%)	
20	49,6	6,9	13,9	Kontrolle A
41	41,4	5,4	13,1	Kontrolle B

Präzision von Tag zu Tag

n	\bar{x}	s	VK (%)	
12	54,2	7,7	14,3	Kontrolle A
16	34,8	5,8	16,7	Kontrolle B

+ = dreifache Standardabweichung des Standardleerwertes
 ++ = die Standardkonzentration, durch die 50% der Aktivität vom Antikörper zu verdrängen ist.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 zusammengefaßt. Daraus läßt sich ableiten, daß das Thyrotropin bei viermonatiger Lagerung bei -20°C stabil bleibt, was für die Konservierung von Standards und Kontrollproben von praktischer Bedeutung ist. Wurden die Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt, so sank der immunologisch meßbare Thyrotropingehalt innerhalb von ein bis zwei Wochen um etwa ein Viertel und nach sechs Wochen auf

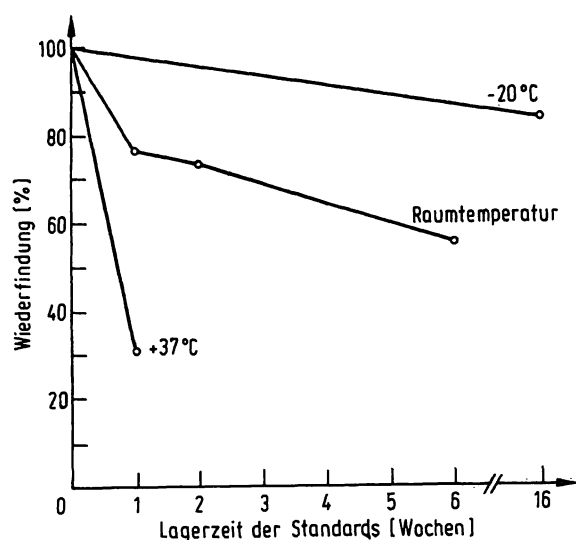


Abb. 2. Stabilität von Thyrotropin im auf Filterpapier getrockneten Blutstropfen. Wiederfindung unterschiedlich gelagerter Standards in Prozent des Ausgangswertes (frisch hergestellter Standards)

etwa die Hälfte der ursprünglichen Konzentration ab. Waren die Proben einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt, fand sich nach einer Woche nur noch etwa 25 % des anfänglichen Thyrotropingehaltes wieder.

2. Beschaffenheit des Filterpapiers

Unterschiede in der Papierqualität könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Elution des Thyrotropin führen. Zur Klärung dieser Frage wurden aus blutfreien Bezirken der Filterpapierkarten von vier Firmen je 5 Plättchen à 8 mm ausgestanzt und gewogen. Daneben wurden Karten mit Thyrotropin-freiem und mit Thyrotropin-haltigem Blut bekannter Hormonkonzentrationen beschickt, auf die übliche Weise getrocknet, Scheibchen ausgestanzt und die Thyrotropin-Konzentration mit der eigenen Methode bestimmt. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Variationskoeffizienten innerhalb der Variation der Methode lagen, d. h. daß die Papierqualität der ver-

Tab. 3. Einfluß der Filterpapierqualität auf das Analysenergebnis. Die Messungen wurden mit der eigenen Methode durchgeführt.

Papiersorte aus Kit Nr.:	Gewicht eines Filterpapier-Plättchens von 8 mm ϕ (mg)	Wiederfindung einer TSH-Probe mit 20 mE/l	Mittelwert der unspezifischen Bindung (Imp/min)
eigene Methode ⁺	134,7	-/-	-/-
1	135,5	21,08	852
2	134,4	21,28	874
3	134,1	18,37	1031
7	134,6	16,19	903
VK (%)	-/-	12,5	8,4

+ Papier Schleicher und Schüll Nr. 2992

wendeten Sorten keinen meßbaren Einfluß auf das Ergebnis hatte.

3. Plättchengröße

Mit der Größenvariation der Filterpapierscheibchen gelangen im Assay unterschiedlich große Blutprobenvolumina zum Einsatz. So entspricht ein Plättchen mit einem Durchmesser von 6,2 mm einer Fläche von 30,19 mm² und ein Plättchen mit 8 mm Durchmesser einer Fläche von 50,27 mm². Das 8 mm-Scheibchen faßt demnach eine etwa 1,5 mal größere Blutmenge als das 6,2 mm-Scheibchen. Mit der eigenen Methode wurden Standardkurven mit unterschiedlich großen Plättchenstandards erstellt und verglichen. Aus den Ergebnissen auf Tabelle 4a geht hervor, daß der 50%-Intercept einer Standardkurve mit 8 mm-Plättchen niedriger lag als mit 6,2 mm-Plättchen, d. h. die Kurve verlief steiler und der Assay war empfindlicher. In der Streuung zeigten sich keine Unterschiede.

4. Entnahmezeitpunkt der Plättchen

Im Hinblick auf die Frage, ob die Filterpapierplättchen als Fremdkörper im Reaktionsgemisch einen Einfluß auf das Testergebnis haben, wurde untersucht, inwieweit die Präzision vom Entnahmezeitpunkt abhängig ist. Dazu wurde in einem Testansatz der eigenen Methode die Hälfte der Filterpapierproben während der gesamten Assaydauer in den Teströhrchen belassen, die andere Hälfte am Ende der Vorinkubation, vor Tracerzugabe, entnommen. Die Tabelle 4b zeigt, daß die Präzision durch Entnahme der Plättchen vor Zugabe der Aktivität um etwa das 2,5-fache verbessert werden konnte, während die Empfindlichkeit nicht nennenswert beeinflußt wurde.

5. Waschen des Präzipitats

Entsprechend den Vorschriften der Mehrzahl der nachfolgend untersuchten kommerziellen Kits verbleiben die Filterpapierproben während der gesamten Testdauer im Assay, wohingegen über die weitere Behandlung des Antigen-Antikörper-Komplexes nach der B/F-Trennung

Tab. 4. Untersuchungen zu variablen Parametern (3–5)

a) Plättchengröße (3)
b) Entnahmezeitpunkt der Plättchen (4) und Waschen des Präzipitats (5).

	50%-Intercept (mE/l)	Mittlerer VK der Dreifachmeßwerte (%)
Plättchendurchmesser		
a 6,2 mm	54,9	2,67
8,0 mm	36,3	2,63
Plättchen vor Tracerzugabe entfernt	34,5	2,10
b Plättchen belassen:		
a) ohne Waschen gezählt	38,6	5,80
b) nach Waschen gezählt	36,7	3,00

ganz unterschiedliche Angaben gemacht werden (0–3 mal Waschen des Pellets). Deshalb wurden in einem Assay nach der eigenen Methode die Plättchen in den Reaktionsgefäßen belassen, die Hälfte der Präzipitate dann nach dem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes sofort im Gamma-Counter gezählt und die andere Hälfte der Präzipitate vor der Messung nochmals mit je 1 ml Polyethylenglykol 6000 (60 g/l) gewaschen. Die Ergebnisse auf der Tabelle 4b zeigen, daß durch Waschen der Präzipitate eine ähnliche Verbesserung der Präzision erzielt werden konnte (etwa 2-fach), wie durch Entfernung der Plättchen vor Tracerzugabe.

Vergleichende Kit-Untersuchungen

Methoden

Sechs der Kits arbeiteten mit der Doppelantikörpermethode, in einem Kit (Nr. 5) wurde die Solid-Phase-Methode verwendet.

Standards

In fünf Kits lagen die Standards fertig in Form von auf Filterpapier getrockneten Blutstropfen vor, die vor der Verwendung mit Hilfe der zugehörigen Zange ausgestanzt werden mußten. Bei einem Kit (Nr. 2) mußten zusätzlich lyophilisierte Serumstandards rekonstituiert werden und zu den ausgestanzten, bereits mit Thyrotropin-freiem Blut versetzten Plättchen pipettiert werden. Ein Kit (Nr. 6) bot die Standards als gebrauchsfertige Plättchen an. Drei Kits waren zwischen der ersten und zweiten Testserie geändert worden: Kit Nr. 4 beinhaltete in der ersten Serie keine definierten Standardverdünnungen, so daß die Auswertung nicht anhand einer Standardkurve vorzunehmen war, sondern durch Zählratenvergleich gegenüber den mit „Positive“, „Negative“ und „Reference“ bezeichneten Standards. Bei der zweiten Serie waren die Thyrotropin-Konzentrationen der Standardplättchen mit angegeben, so daß zumindest im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen eine Standardkurve, wenn auch nur mit vier Standardpunkten (einschließlich B_0) erstellt werden konnte. Für Kit Nr. 5 mußte der Untersucher während der ersten Testserie die Standardverdünnungsreihe mit selbst gewonnenem Thyrotropin-armen Blut anlegen, die Firma stellte lediglich Thyrotropin MRC 68/38 hierzu zur Verfügung. Kit Nr. 6 enthielt die Standards zunächst zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknet, später die bereits ausgestanzten Plättchen.

Reagenzien

Die Assay-Reagenzien wurden von zwei Firmen (Nr. 1 und Nr. 6) in lyophilisierter Form angeboten, von einem Hersteller (Nr. 4) in Lösung und von den übrigen zum Teil gelöst, lyophilisiert und als Trockensubstanz.

Filterpapierscheibchen

Die Firmen boten grundsätzlich unterschiedliche Stanzungen zu ihren Packungen mit an. Der Durchmesser der

Blutplättchen schwankte insgesamt zwischen 3 und 8 mm.

Inkubationszeit und Inkubationstemperatur

Die vorgeschriebenen Inkubationszeiten waren in allen sieben Kits unterschiedlich, wobei die kürzeste Testdauer 24 Stunden (Nr. 6) und die längste 73 Stunden (Nr. 7) betrug. Kit Nr. 3 verkürzte zwischen erster und zweiter Serie der Untersuchungen seine Inkubationsdauer von 44 auf 22 bis 25 Stunden. Mit einer Ausnahme (Nr. 4) waren alle Kits auf eine Inkubation bei Raumtemperatur eingestellt. Bei Kit Nr. 4 mußten die Reaktionsgefäße während der 2-stündigen B/F-Trennungszeit bei +4 °C gehalten werden.

Trennung von gebundenem und freiem Hormon

Nach Zugabe des 2. Antikörpers (außer bei Kit Nr. 5 = Solid-Phase-Methode) und vor Zentrifugation wurden, ausgenommen Kit Nr. 7, noch weitere Reagenzien zum Reaktionsgemisch gegeben. Dies waren, je nach Kit, Aqua destillata, physiologische NaCl-Lösung oder Polyethylenglykol. Dabei mußte bei Kit Nr. 3 und Nr. 7 noch ein einmaliger Waschvorgang, bei Kit Nr. 5 noch dreimaliges Waschen angeschlossen werden.

Entnahme der Filterpapierscheibchen

Mit einer Ausnahme (Nr. 6) mußten bei allen Kits die Blutplättchen während des gesamten Assays in den Reagenzröhrchen belassen werden. Bei Kit Nr. 6 wurden die Plättchen vor Zugabe des Tracers entfernt.

Kit-Preise

Die Preise der Kits lagen zwischen DM 1,50 und DM 3,30 pro Meßwert. Bei regelmäßiger Abnahme größerer Mengen von Testpackungen wurde im allgemeinen ein Preisnachlaß zugesagt. Die darüber hinausgehenden Kosten (Arbeitszeit, Verbrauchsmaterial, Raumkosten etc.) müssen von jedem Labor zusätzlich kalkuliert werden.

Einzelheiten über Testbestecke, Handhabung und Testaufbau der Kits sind in Tabelle 5 dargestellt.

Vergleich der Kits mit der eigenen Methode

In den Tabellen 6 und 7 (a/b) sind die aus den beiden Untersuchungsserien erhaltenen Daten zu den Standardkurven der Kits aufgelistet.

Die Abbildungen 3 (a–d) zeigen Beispiele von Standardkurven der sieben getesteten Kits und der eigenen Methode. Die Ergebnisse von erstem und zweitem Teil der beiden Untersuchungsserien wurden in den Abbildungen 4 (a–d) in Form von Regressionsgeraden graphisch dargestellt.

Soweit den Kitpackungen Kontrollen mit angegebener Sollkonzentration von Thyrotropin beigelegt waren, wurde im jeweiligen Kit diese Konzentration richtig wiedergefunden. Für die Vergleichbarkeit untereinander gilt das gleiche wie für die Vergleichbarkeit der Standards.

Tab. 5. Methodische Daten der Kits

Kit Nr.	Serie	Methode	Trennverfahren	Anzahl der Standard-Meßpunkte	Plättchengröße (mm ϕ)	Standards	Reagenzien	Assaydauer (h)	Inkubationstemperatur	Plättchenhandhabung	Waschen des Präzipitats	Preis pro Einzelbestimmung (DM)
1	1	Doppel-Antikörper	Zentrifugieren mit Reagenz unbekannter Zusammensetzung	6	5	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen	lyophilisiert + dest. Wasser + Puffer	40-64	Raumtemperatur	belassen	ϕ	2,05
2	2	wie Serie 1	Zentrifugieren mit dest. Wasser	6	7	wie Serie 1	wie Serie 1	40-64	Raumtemperatur	belassen	ϕ	1,80
3	1 und 2	Doppel-Antikörper	Zentrifugieren mit Polyethylenglykol	6	6,4	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen + lyophilisierte Serumstandards	lyophilisiert und in Pulverform, + dest. Wasser + physiolog. NaCl-Lösung	24-30	Raumtemperatur	belassen	ϕ	1,50
4	1 und 2	Doppel-Antikörper	Zentrifugieren mit dest. Wasser	7	6,5	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen	In Lösg., in Pulverform, lyophil. + dest. Wasser + Puffer	44	Raumtemperatur	belassen	1 x mit dest. Wasser	1,50
5	1 und 2	Solid Phase	Zentrifugieren mit physiolog. NaCl-Lösung	ϕ (4)	2 x 3,2	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen	In Lösung	50	Raumtemperatur +4 °C	belassen	ϕ	3,30
6	1 und 2	Doppel-Antikörper	Zentrifugieren mit Polyethylenglykol	8	8	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen	lyophilisiert + dest. Wasser	24	Raumtemperatur	entfernen vor Tracerzugabe	ϕ	2,50
7	1 und 2	Doppel-Antikörper	Zentrifugieren	7	7	Zum Ausstanzen auf Filterpapier getrocknete Blutstropfen	In Lösung und lyophil. + dest. Wasser + Puffer	32-73	Raumtemperatur	belassen	1 mal mit Waschblö. Puffer + dest. Wasser	2,48

Tab. 6. Daten zu den Kit-Standardkurven

Kit-Nr.	Serie	Untere Nachweisgrenze (mE/l)	50%-Intercept (mE/l)	B ₀ /T Zählratenquotienten	N/T Zählratenquotienten
eigene Methode	\bar{x}	6,4	31,3	0,08	0,02
1	1	17,5	59,5	0,37	0,13
	2	8,5	63,5	0,40	0,11
2	1	4,5	50,4	0,30	0,11
	2	3,2	49,0	0,32	0,09
3	1	14,8	26,7	0,38	0,12
	2	17,3	44,9	0,15	0,02
4	1	—	—	—	—
	2	10,3	72,3	0,30	0,08
5	1	0,4	51,0	0,11	0,01
	2	3,8	39,3	0,11	0,05
6	1	3,2	33,1	0,13	0,06
	2	8,4	20,0	0,25	0,04
7	1	4,5	49,9	0,44	0,16
	2	8,3	51,9	0,33	0,04

Tab. 7. Messung von Kontrolle B in den Kits
(Thyrotropin-Mittelwert mit eigenem Test: 34,8 mE/l)

a			
Kit-Nr.	Wiederfindung von Kontrolle B in den Kits (mE/l)		
	Serie 1	Serie 2	
1	125,9	53,6	
2	176,4	118,5	
3	33,5	43,3	
4	kein Meßwert	49,4	
5	26,1	34,1	
6	kein Meßwert	40,1	
7	17,1	35,0	
b			
	Statistische Daten		
	Serie 1 alle Kits	Serie 2 alle Kits	Serie 2 ohne Kit Nr. 2
\bar{x}	75,8	53,4	42,5
s	71,3	29,5	7,7
VK (%)	94,0	55,3	18,3

Diskussion

Aus theoretischen Überlegungen (8) ist leicht ableitbar, daß der Vorhersagewert (predictive value) eines Laborergebnisses, d. h. die Wahrscheinlichkeit, mit der man von einem pathologischen Wert auf einen krankhaften Zustand schließen kann, abhängig ist von der Qualität der Methode (Präzision, analytische und diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität) und der Prävalenz der

Erkrankung in dem zu untersuchenden Kollektiv. Letztere liegt für die konnatale Hypothyreose zwischen 1:3000 und 1:6000. Um zu verhüten, daß die geringere Zahl von zu erwartenden pathologischen Ergebnissen von einer weit größeren Anzahl falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse überlaufen wird, ist für den Einsatz einer Methode zu Screeningzwecken eine noch höhere Präzision erforderlich als zur Untersuchung jeder anderen Patientengruppe. Jedes falsch positive Ergebnis verursacht unnötige Folgekosten, jedes falsch negative Ergebnis stellt den Wert der Untersuchung infrage.

Für die Bestimmung des Thyrotropin beim Neugeborenen steht zudem die Notwendigkeit einer raschen Diagnosestellung im Vordergrund. Anhand der eigenen Methode, wie auch einiger kommerzieller Kits, zeigte es sich, daß auch bei Verkürzung der Testdauer auf 24 Stunden genügend empfindliche und reproduzierbare Assays aufgebaut werden können.

Aus praktischen Gründen sollten, wie in den meisten Kits verwirklicht, nur Antisera verwendet werden, die ihr Bindungsmaximum bei Raumtemperatur erreichen, um die umständliche Inkubation im Kühlraum oder Kühlschrank zu vermeiden (2).

Spezielle Probleme entstehen bei der Thyrotropinbestimmung bei Neugeborenen durch die Verwendung von Filterpapier als Probenträger. So decken sich die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen über die Lagerfähigkeit der Plättchenstandards nur teilweise mit der entsprechenden Literatur (9, 10). Unsere eigene Methode verlangt eine besonders sorgfältige Behandlung der Standards und Proben, wobei auch eine kurzzeitige Lagerung (1 Woche) bei Raumtemperatur vermieden werden muß. Möglicherweise hängt der von uns gefundene Abfall der Hormonkonzen-

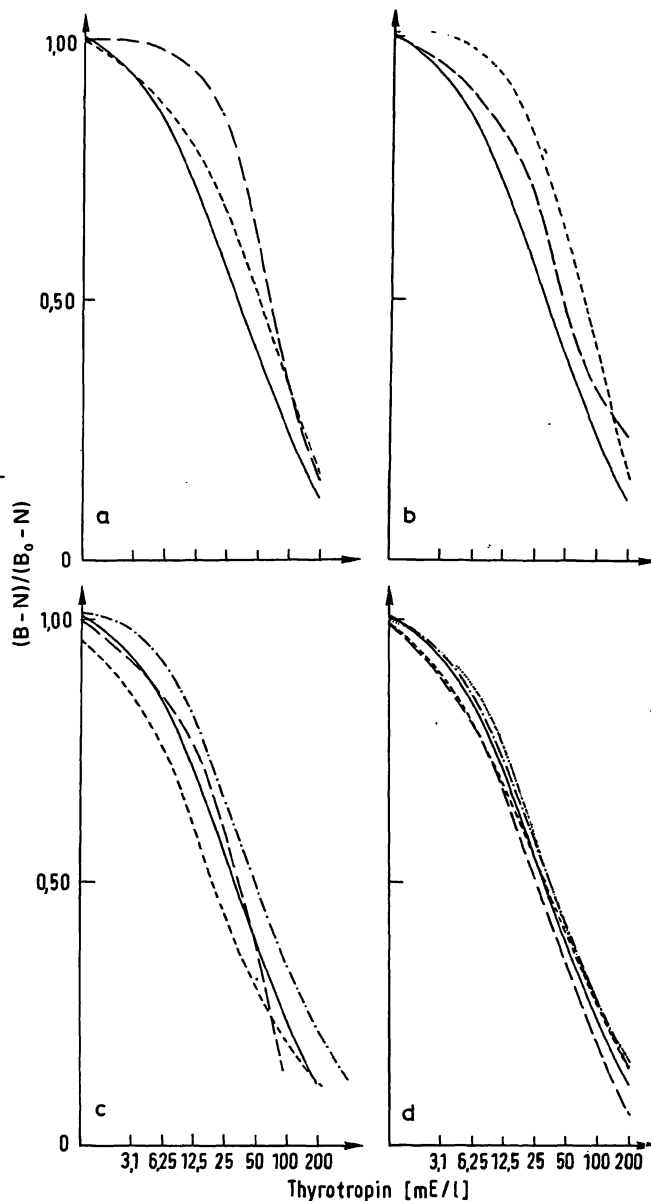


Abb. 3. Thyrotropin-Standardkurven

- a) - - Standardkurve Kit Nr. 1
- ... Standardkurve Kit Nr. 2
- Standardkurve — eigene Methode
- b) - - Standardkurve Kit Nr. 3
- ... Standardkurve Kit Nr. 4
- Standardkurve — eigene Methode
- c) - - Standardkurve Kit Nr. 5
- ... Standardkurve Kit Nr. 6
- · - Standardkurve Kit Nr. 7
- Standardkurve — eigene Methode
- d) Standardkurven der eigenen Methode aus an 5 verschiedenen Tagen durchgeführten Assays

tration von dem verwendeten Antikörper ab, der nur intaktes Thyrotropin bindet. Mit einem Antikörper, der intaktes Hormon und Bruchstücke gleich fest bindet, wäre kein Konzentrationsverlust nachweisbar. Inwieweit tatsächlicher Hormonverlust durch beispielsweise enzymatischen Abbau vorliegt, ist noch ungeklärt. Die „Haltbarkeit“ der Proben muß demnach für jedes System einmal getestet werden.

Der Einfluß des Hämatokrit auf die gemessene Hormonkonzentration sowie die Inhomogenität der Hormonverteilung innerhalb des Blutflecks auf dem Filterpapier wurde von Illig et al. untersucht (9).

Zur Aufbewahrung und zum Versand scheint es am günstigsten, die Standards auf den Filterpapierkarten zu belassen und erst unmittelbar vor Assaybeginn auszustanzten. Fertige Plättchenstandards, wie sie von einer Firma (Nr. 6) angeboten werden, können den Nachteil haben, daß sie nicht mit derselben Zange gewonnen werden, wie die unbekannten Proben. Eine noch größere Uneinheitlichkeit zwischen Standards und Proben ergibt sich, wenn die Standardreihe durch Zugabe von Serumverdünnungen zu Thyrotropin-freien Blutplättchen erstellt wird, die zu untersuchenden Proben aber aus den auf Filterpapier getrockneten Blutflecken ausgestanzt werden (Kit Nr. 2). Ein solches Vorgehen ist aus prinzipiellen Überlegungen abzulehnen.

Durch das Fehlen einer Standardkurve nimmt Kit Nr. 4 eine Sonderstellung ein. Hier wird die Entscheidung gesund/krank mit Hilfe von Kontrollseren gefällt, deren genaue Konzentrationen dem Anwender nicht bekannt sind. In anderen Worten ausgedrückt, wird die Entscheidung von der Firma gefällt. Dies scheint uns zu einem Zeitpunkt, da mangels größerer Erfahrung noch keine Einigkeit über den „cut-off value“ besteht (Thyrotropinkonzentration 20 bis 50 mE/l Blut), ein bedenkliches Vorgehen.

Die Beschaffenheit der hier untersuchten Filterpapiersorten hat keinen meßbaren Einfluß auf die Ergebnisse, wohl aber die Größe der Scheibchen. Da die Plättchen im Inkubationsansatz ganz mit Flüssigkeit bedeckt sein müssen, ist ihre Größe durch die Röhrchenabmessung und die Reagenzienmenge limitiert. Plättchenstandards mit einem Durchmesser von 8 mm lassen sich noch zuverlässig eluieren. Assays mit kleineren Plättchen sind unempfindlicher.

Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, kann die Präzision der Ergebnisse durch Entfernung der Filterpapierproben vor Zugabe der Aktivität in ähnlicher Weise verbessert werden wie durch Waschen der Präzipitate nach dem Zentrifugieren. Die beiden Möglichkeiten halten sich hinsichtlich Arbeitsaufwand die Waage.

Bei der Testung von Methodik und Standards der Kits handelte es sich um rein vergleichende Untersuchungen ohne das Ziel einer qualitativen Bewertung der kommerziellen Methoden. Die eigene Methode erhebt nicht den Anspruch auf optimale Assaybedingungen, sondern dient lediglich als Vergleichssystem. Ebenso wenig kann eine Aussage über die Richtigkeit der geprüften und eingesetzten Standards und Proben von Kits und des eigenen Tests gemacht werden, da eine entsprechende Referenzmethode oder gar absolut messende Methode fehlt. Ziel der Untersuchung war es, die Vergleichbarkeit insbesondere hinsichtlich Präzision und Empfindlichkeit der sieben Kit-Methoden herauszuarbeiten.

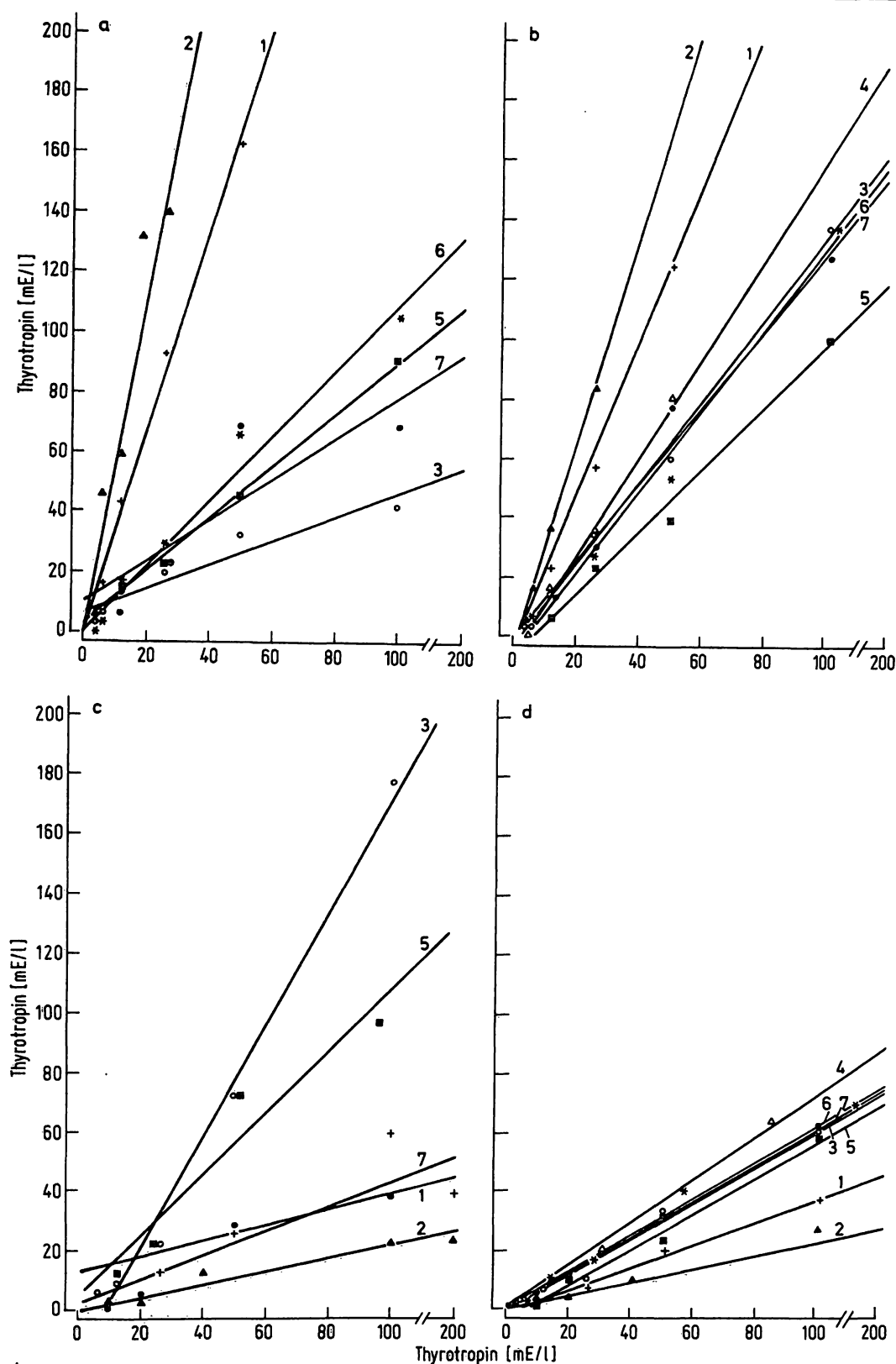


Abb. 4. Korrelation der Methoden

- a) 1. Teil aus Untersuchungsserie 1.
Messung der eigenen Standards in den kommerziellen Kits.
Abszisse: Sollwerte der eigenen Standards
Ordinate: Wiederfindung in den Kit-Methoden
Symbole: + — Kit Nr. 1; Δ — Kit Nr. 2;
o — Kit Nr. 3; \triangle — Kit Nr. 4; \blacksquare — Kit Nr. 5;
* — Kit Nr. 6; \bullet — Kit Nr. 7.
r von 0,84 bis 0,99; b von 0,41 bis 6,68
- b) 1. Teil aus Untersuchungsserie 2.
Darstellung wie in Abb. 4a
r von 0,98 bis 0,99; b von 1,05 bis 3,44

- c) 2. Teil aus Untersuchungsserie 1.
Messung der Kitstandards im eigenen Assay
Abszisse: Sollwerte der Kit-Standards
Ordinate: Wiederfindung im eigenen Assay
Symbole wie in Abb. 4a
r von 0,84 bis 0,99; b von 0,22 bis 1,85
- d) 2. Teil aus Untersuchungsserie 2.
Darstellung wie in Abb. 4c
r = 0,99 (für alle Geraden), b von 0,23 bis 0,73

Die Ergebnisse aus der 1. Serie der Untersuchungen zeigten keinerlei Übereinstimmung. Bei Messung der eigenen Standards in den Kits lag die Wiederfindung zwischen 41 und 568%. Die methodenabhängigen Unterschiede sind auch aus den Meßwerten von Kontrolle B in den Kits ersichtlich (Tab. 7a). Danach konnte der gesuchte Thyrotropin-Wert je nach verwendetem Kit sowohl im Normalbereich unter 25 mE/l Blut liegen (Kit Nr. 7), als auch grenzwertig zwischen 25 mE/l und 50 mE/l (Kit Nr. 3 und 5) und sogar im eindeutig pathologischen Bereich über 100 mE/l (Kit Nr. 1 und 2) liegen (9). Da alle Firmen mehr oder weniger den gleichen, wohl aus der Literatur entnommenen Normalbereich angeben, hinge das Schicksal des Säuglings nicht zuletzt davon ab, mit welchem Kit seine Blutprobe bestimmt würde.

Die Wiederfinderate der Kit-Standards im eigenen Assay lag zwischen 22 und 185%. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Kreuzexperimente könnten unter anderem durch die Einflüsse der verschiedenartigen Probenmatrix erklärt werden.

Änderungen in einigen Kits, die zwischen erster und zweiter Serie der Untersuchungen von Seiten der Firmen vorgenommen wurden, sind möglicherweise eine Erklärung dafür, daß die Resultate der zweiten Testserie nicht mehr so extreme Abweichungen beinhalteten. So lag die Wiederfinderate der Kitstandards im eigenen Meßsystem zwischen 23 und 73%. Bei Messung der eigenen Standards in den Kits lag die Wiederfindung zwischen 104 und 404%. Die Meßwerte von Kontrolle B in den verschiedenen Kits (Tab. 7b) zeigen, daß besonders eine Methode (Nr. 2) für diese Schwankungsbreite verantwortlich war, daß aber mit den übrigen Kits im empfindli-

chen Bereich der Standardkurven angenäherte Werte gefunden wurden.

Abgesehen von Kit Nr. 4 wiesen alle Methoden (Resultate aus 1. und 2. Untersuchungsreihe) eine mit einem 50%-Intercept von 20,0 bis 63,5 mE/l zwar deutlich variierende, aber der Fragestellung entsprechend ausreichende Empfindlichkeit auf.

Im Hinblick auf die bundesweite Einführung des Neugeborenen-Screenings zur Erkennung der konnatalen Hypothyreose durch die Thyrotropin-Bestimmung aus dem Blutstropfen auf Filterpapier scheint uns die Situation auf dem Kit-Markt verbesserungsbedürftig. Grobe methodische Fehler (unterschiedliche Behandlung von Standards und Proben, fehlende Standardkurve) bedürfen keiner gesonderten Diskussion mehr. Aus keiner unserer Voruntersuchungen über Kits für Insulin, Wachstumshormon (hGH), Thyrotropin, Thyroxin (T_4), Triiodthyronin (T_3) und Digoxin, die wir im Rahmen der externen Qualitätskontrolle durchführten, sind uns annähernd vergleichbare Schwankungen der Standards bekannt. Vielmehr waren die Standards gewöhnlich das einzig Übereinstimmende. Hier liegt sicher noch eine leicht praktikable Möglichkeit der Verbesserung der Inter-Kit-Varianz. In Ermangelung einer gültigen Referenz-Methode erscheint uns die gemeinsame Erarbeitung verbindlicher methodischer Richtlinien — einschließlich Standards — wünschenswert und machbar. Neben der Pflicht zur internen Qualitätskontrolle für alle beteiligten Laboratorien ist eine dauerhafte, regelmäßige externe Qualitätskontrolle, zum Beispiel unter der Federführung einer der beiden Fachgesellschaften, Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie und Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, unvermeidlich.

Literatur

1. Zabransky, S. & Sitzmann, F. C. (1979), *Deutsch. Ärzteblatt* 33, 2085–2088.
2. Erhardt, F., Marschner, I., Pickardt, C. Renate & Scriba, P. C. (1973), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 11, 381–387.
3. Wood, W. G., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1979), *Horm. Metab. Res.* 11, 309–317.
4. Wood, W. G., Stalla, G., Müller, O. A. & Scriba, P. C. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 111–114.
5. Erhardt, F. W. & Scriba P. C. (1977), *Acta Endocrinol (Kbh)* 85, 698–712.
6. Greenwood, F. W., Hunter, W. M. & Glover, J. (1963), *Biochem. J.* 89, 114–123.
7. Marschner, I., Dobry, H., Erhardt, F., Landersdorfer, T., Popp, B., Ringel, C. & Scriba, P. C. (1974), *Ärzt. Lab.* 20, 184–191.
8. Büttner, J. (1977), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 15, 1–12.
9. Illig, Ruth & Vera Roda, C. R. (1976), *Schweiz. Med. Wochenschr.* 106, 1676–1681.
10. Miyai, K. & Oura, T. (1976), *New. Engl. J. Med.* 294, 904.
11. Zabransky, S. (1979), *Kinderarzt* 10, 16–17.

Dr. med. Dagmar van Thiel
Dr. med. Ingo Marschner
Dr. William Graham Wood, PhD
Dr. med. Jürgen Habermann
Prof. Dr. med. Peter Christian Scriba
Medizinische Klinik Innenstadt
der Universität München,
Ziemssenstraße 1
8000 München 2